

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 10 月 31 日 (31.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/086142 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12P 33/06, C07J 63/00, C07H 15/256 (74) 代理人: 久保田 藤郎, 外(KUBOTA,Fujio et al.); 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目3番12号 E-1 ビル Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/03612
- (22) 国際出願日: 2002 年 4 月 11 日 (11.04.2002) (81) 指定国 (国内): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-117449 2001 年 4 月 16 日 (16.04.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 林 宏明 (HAYASHI, Hiroaki) [JP/JP]; 〒502-8585 岐阜県岐阜市三田洞東5-6-1 岐阜薬科大学内 Gifu (JP). 井上 謙一郎 (INOUE, Kenichiro) [JP/JP]; 〒502-8585 岐阜県岐阜市三田洞東5-6-1 岐阜薬科大学内 Gifu (JP). 谷 匡人 (TANI, Masato) [JP/JP]; 〒222-8567 神奈川県横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会社 薬品総合研究所内 Kanagawa (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SOYASAPOGENOL B

(54) 発明の名称: ソヤサポゲノールBの製造法

(57) Abstract: It is intended to provide a novel process for producing soyasapogenol B which is useful as a drug or a material for producing drugs. Sophoradiol employed as a starting material is treated with a hydroxylase originating in a plant to thereby hydroxylate the compound at its 24-position. Thus, the target soyasapogenol B can be efficiently produced.

(57) 要約:

本発明は、医薬品もしくは医薬品の原料として有用なソヤサポゲノールBの新規な製造法を提供することを目的とする。

ソフォラジオールを原料とし、これに植物由来の水酸化酵素を作用させて、当該化合物の24位を水酸化することにより、目的とするソヤサポゲノールBを効率よく製造することができる。

## 明 細 書

## ソヤサポゲノール B の製造法

## 技術分野

本発明は、ソヤサポゲノール B (soyasapogenol B) の製造法に関し、詳しくは植物の水酸化酵素を用いて、ソフォラジオールからソヤサポゲノール B を製造する方法に関する。

## 背景技術

ソヤサポゲノール B (12-oleanane-3, 22, 24-triol) は、大豆種子より単離、構造決定されたオレアナン骨格を有するトリテルペン (Chem. Pharm. Bull. 24, p121-129, 1976、Chem. Pharm. Bull. 30, p2294-2297, 1982) であり、その配糖体であるソヤサポニン はマメ科植物に広く分布している。

これまでにソヤサポゲノール B に関しては、抗補体活性、血小板凝集抑制作用 (特開昭 61-37749 号公報)、抗腫瘍活性 (特開平 10-234396 号公報) および肝保護作用 (Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, p85-88, 1997) などが報告されており、医薬品もしくは医薬品原料としての有用性が期待されている。

ソヤサポゲノール B の製造法としては、大豆種子に含有されるサポニンの糖鎖を加水分解したのち、ソヤサポゲノール B を精製する方法が知られている。しかし、この方法は大豆種子に含有されているサポニンの割合が約 0.2 % (薬学雑誌、104, p162-168, 1984) と少ないため、効果的な方法でなく、実用的でない。

そこで、本発明の目的は、ソヤサポゲノール B の効率的な製造法を確

立することである。

#### 発明の開示

本発明者らは、ソヤサポゲノール B と構造的に類似するソフォラジオール (12-oleanene-3, 22-diol) に着目した。この化合物は、槐花 (エンジュ) に含まれている成分として報告されている (薬学雑誌、78, p1090-1094, 1958)。

このソフォラジオールの 24 位を水酸化することにより、目的とするソヤサポゲノール B を生産することが可能である。しかしながら、化学合成的な手法で位置選択的に水酸基を導入することは困難である。

従来より、位置選択的に水酸基を導入する方法として、微生物による培養変換法が古くから研究されており、ステロイド類では位置選択的に水酸基を導入する微生物が多数発見されている。一方、植物の生合成機能を利用する方法に関する研究も進められており、例えば培養細胞を用いた水酸化や配糖化などが試みられている。

これまでに、カンゾウの培養細胞がグリシルレチン酸 (3-Hydroxy-11-oxo-12-oleanene-30-oic acid) の 24 位を水酸化して、24-ヒドロキシグリシルレチン酸を生成することが報告 (Phytochemistry、34, p1303-1307, 1993) されているが、ソフォラジオールを水酸化してソヤサポゲノール B を生産したことは報告されていない。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、カンゾウ (*Glycyrrhiza glabra*) 培養細胞から酵素画分を調製し、この酵素を用いてソフォラジオールの 24 位を水酸化するための条件について検討した。その結果、カンゾウ培養細胞のミクロソーム画分に NADPH とソフォラジオールを添加してインキュベートするこ

とにより、ソヤサポゲノールBを生産することに成功し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、植物由来の水酸化酵素を用いて、ソフォラジオールからソヤサポゲノールBを生産することを特徴とするソヤサポゲノールBの製造法である。

上記したように、本発明では植物由来の水酸化酵素を用いるが、植物としては、ソヤサポゲノールBを生合成するための水酸化酵素を含むものであれば良い。この酵素は、オレアナン骨格の24位を水酸化する機能を有すると考えられることから、植物はカンゾウに限定されるものではなく、ソヤサポゲノールBを含有するマメ科の植物であるダイズ、クララ、アルファルファなども利用できる。これらは、同一の生合成経路を有しており、分類上同一の酵素が存在すると考えられる。

また、当該酵素を含む植物の形態としては、特に制限がなく、種子から発芽して間もない幼植物体、栽培した植物体、あるいはカルスなどの培養細胞等のいずれであっても良い。

次に、植物から水酸化酵素を抽出、精製する方法について説明する。まず、植物あるいは当該植物の細胞を適当な方法で破砕し、これを抗酸化剤、酵素の安定化剤、ポリフェノール吸着剤、金属配位子などを含む緩衝液中で攪拌する。次いで、ろ過や遠心沈降などの操作を適用して不溶物を除去して酵素を抽出する。

得られた酵素の比活性を高めるための方法について述べると、超遠心等により粗抽出液からミクロソーム画分を調製する方法が有効である。また、ゲルろ過やイオン交換樹脂などの常法によってさらに酵素の比活性を高めることも可能である。このようにして酵素画分を調製する。

本発明に係るソヤサポゲノールBは、以下の方法で製造することができる。適当な緩衝液に懸濁した酵素画分に、NADPH およびソフォラジオリ

ールを加えてインキュベートする。すなわち、酵素画分に元の植物の新鮮重量より少ない量の緩衝液、好ましくは新鮮重量 1 / 5 から 1 / 5 0 量の緩衝液を加えて懸濁し、NADPH を終濃度 0.1 ~ 1.0 mM および原料のソフォラジオールを終濃度 1.0 ~ 1000  $\mu$ M となるようにそれぞれ添加した後、インキュベートする。緩衝液の種類としては、生物学的な影響を及ぼさない緩衝液が使用可能であり、好ましくは中性領域 (pH 7.0 ~ 7.5) に緩衝能を有するトリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液などが挙げられる。インキュベートの条件については、15 ~ 37 °C で 10 分 ~ 数時間、好ましくは 30 ~ 120 分間行う。

反応終了後、有機溶媒、例えばエーテル、酢酸エチル、クロロホルムなどを用いて懸濁液から数回、通常は 2 回抽出を行い、ソヤサポゲノール B 抽出液を得る。

得られたソヤサポゲノール B 抽出液は、シリカゲルやオクタデカシル (ODS) - シリカゲルで処理してソヤサポゲノール B を精製することができる。なお、単にソヤサポゲノール B が生産されたことを確認するだけであれば、上記有機溶媒抽出液を薄層クロマトグラフィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー (GC)、ガスクロマトグラフィー / 質量分析法 (GC-MS)、液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC-MS) などの分析手段により検出、定量することができる。

以下に、本発明を実施例によって説明するが、本発明は実施例に限定されるものではなく、本発明によって明らかにされた事実に基づいて、酵素学的にソヤサポゲノール B を生産する手法をすべて包含する。

#### 実施例 1

カンゾウ培養細胞は、カンゾウ (*Glycyrrhiza glabra*) の幼植物より誘導したカルスを 100  $\mu$ M のナフトレン酢酸と 1  $\mu$ M の 6-ベンジル

アミノプリンを含むLinsmaier-Skoog 液体培地で継代培養 (Phytochemistry, 29, p3127-3129, 1990) したものをを用いた。

この細胞を、ソヤサポニン生産培地である  $1 \mu\text{M}$  のナフタレン酢酸と  $10 \mu\text{M}$  の 6-ベンジルアミノプリンを含むLinsmaier-Skoog 液体培地に移植した後、10日目に細胞を収穫 (30 g 新鮮重) した。次いで、細胞を液体窒素で凍結して乳鉢中で粉碎後、ポリビニルポリピロリドン (PVPP) 3 g と、0.25 M ショ糖、2 mM EDTA、20 mM 2-メルカプトエタノールを含む0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 60 ml を加えてホモジナイズした。

これをガーゼでろ過し、 $10,000 \times g$  で10分間遠心した。遠心上清について、さらに  $10,000 \times g$  で30分間遠心して得られた沈殿部に、20%グリセロール、2 mM EDTA、20 mM 2-メルカプトエタノールを含む0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 6 ml を加えて懸濁し、これをミクロソーム画分とした。この画分には、モノオキシゲナーゼとして作用するチトクローム P450 が含まれている。

ミクロソーム画分 1 ml に、NADPH (終濃度 2 mM) およびソフォラジオール (終濃度  $50 \mu\text{M}$ 、Bioorg. Med. Chem. Lett., 7, P85-88, 1997 記載の方法により合成) をそれぞれ加え、 $20^\circ\text{C}$  で30分間インキュベートした。

反応終了後、これをエーテル 5 ml で2回抽出した後、乾固してから  $200 \mu\text{l}$  のメタノールに溶解した。

抽出液をLC-MS (Hewlett-Packard 製、HP1090) で分析し、保持時間並びにマスフラグメントをソヤサポゲノールBの標品 (和光純薬製) と比較した。その結果、ソヤサポゲノールBの生産を確認することができた (ソフォラジオールからの変換率: 7.6%)。なお、LC-MS による分析条件と検出したマススペクトルを以下に示した。

## 1. 分析条件

カラム : Capcell pak CN、 4.6 X 250 mm (資生堂製)

移動相 : A : 50 mM 酢酸アンモニウム、 0.1%トリフルオロ酢酸

B : メタノール

C : 水

0 分      A    5 %、 B    20 %、 C    75 %

2.0 分    A    5 %、 B    95 %、 C    0 %

3.0 分    A    5 %、 B    95 %、 C    0 %

流速    : 0.8 ml / min

カラム温度 : 40 °C

## 2. 溶出時間およびマスフラグメント

ソフォラジオール :

21.9 分、  $m/z=443[M+H]^+$  ,  $425[M+H-H_2O]^+$  ,  $407[M+H-2H_2O]^+$

ソヤサポゲノール B :

21.0 分、  $m/z=459[M+H]^+$  ,  $441[M+H-H_2O]^+$  ,  $423[M+H-2H_2O]^+$

## 産業上の利用可能性

本発明は、植物の水酸化酵素を利用したソヤサポゲノール B の効率的な製造法を提供する。ソヤサポゲノール B は、医薬品もしくは医薬品の合成原料として有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 植物由来の水酸化酵素を用いて、ソフォラジオールからソヤサポゲノールBを生産することを特徴とするソヤサポゲノールBの製造法。
2. 植物由来の水酸化酵素が、カンゾウ、ダイズ、クララまたはアルファルファ由来の水酸化酵素である請求項1記載のソヤサポゲノールBの製造法。
3. カンゾウ培養細胞のミクロソーム画分にNADPH とソフォラジオールを添加してインキュベートすることを特徴とするソヤサポゲノールBの製造法。
4. カンゾウ培養細胞のミクロソーム画分にNADPH を終濃度0.1～10 mM、ソフォラジオールを終濃度10～1000  $\mu$ Mとなるように加えてインキュベートすることを特徴とする請求項3記載のソヤサポゲノールBの製造法。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03612

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P33/06, C07J63/00, C07H15/256

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P33/06, C07J63/00, C07H15/256

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hiroaki HATASHI et al., "Glycyrrhetic acid 24-hydroxylase activity in microsomes of cultured licrice cells", Phytochemistry, 1993, Vol.34, No.5, pages 1303 to 1307	1-4
A	WO 97/3088 A1 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 30 January, 1997 (30.01.97), Claims; examples & EP 879824 A1 & US 6306862 B1	1-4
A	JP 57-163331 A (Kikkoman Corp.), 07 October, 1982 (07.10.82), Claims; examples (Family: none)	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 July, 2002 (02.07.02)

Date of mailing of the international search report  
16 July, 2002 (16.07.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P33/06, C07J63/00, C07H15/256

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P33/06, C07J63/00, C07H15/256

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Hiroaki Hatashi et al. "Glycyrrhetic acid 24-hydroxylase activity in microsomes of cultured licrice cells" Phytochemistry, 1993, Vol. 34, No. 5, p. 1303-1307	1-4
A	WO 97/3088 A1 (明治製菓株式会社) 1997. 01. 30, 特許請求の範囲、実施例等参照, & EP 879824 A1 & US 6306862 B1	1-4
A	JP 57-163331 A (キッコーマン株式会社) 1982. 10. 07, 特許請求の範囲、実施例等参照, ファミリーなし	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 07. 02

国際調査報告の発送日

16.07.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488